

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-213

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月5日

A 61 K 37/02
47/36C 8615-4C
7417-4C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全7頁)

⑮ 発明の名称 生理活性ペプチド持続製剤

⑯ 特 願 昭63-258117

⑰ 出 願 昭63(1988)10月13日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)10月19日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-263263

㉑ 発 明 者 北 野 静 雄 徳島県板野郡北島町中村字竹ノ下16-6

㉒ 発 明 者 北 里 健 二 徳島県徳島市北田宮3-7-35

㉓ 出 願 人 大鵬薬品工業株式会社 東京都千代田区神田錦町1-27

㉔ 代 理 人 弁理士 田 村 巖

明 細 書

1. 発明の名称 生理活性ペプチド持続製剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ヒアルロン酸又はその非毒性塩を有効成分として含有し、生理活性ペプチドの効果を持続させることを特徴とする生理活性ペプチド持続製剤。
- (2) 生理活性ペプチドが副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン、卵巣刺激ホルモン、ソマトメジン、成長ホルモン放出因子、上皮成長因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、ソマトスタチン、プロラクチン、バソプレシン、バソトシン、ノソトシン、イソトシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、カルシトニン、インシュリン、グルカゴン、レニン、アンギオテンシン、ガストリン、セクレチン、パンクレオサイミン、エンテログストロン、パロチン、カリグレイン、インターフェロン(IFN)、インターロイキン、腫瘍壊死因子(TNF)、マクロファージ活性化因子、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)又は

はそれらの誘導体である請求項1記載の生理活性ペプチド持続製剤。

(3) 生理活性ペプチドが成長ホルモン、カルシトニン、エルカトニン又はインシュリンである請求項1又は2記載の生理活性ペプチド持続製剤。

(4) ヒアルロン酸又はその非毒性塩の分子量が50万~300万である請求項1又は2記載の生理活性ペプチド持続製剤。

(5) 注射剤である請求項1又は2記載の生理活性ペプチド持続製剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は生理活性ペプチド持続製剤に関する。

(従来の技術)

生理活性ペプチド製剤はその殆どがヒトあるいは動物の臓器より抽出、精製され、製剤化されるため、その量に制限があり、それらを必要とする患者に十分供給できず、又、その価格も高価である。これら生理活性ペプチド製剤はその大部分が

注射剤であるため、頻回投与を必要とする患者にとつては極めて繁雑であり、精神肉体的苦痛など大きな負担となつている。

体内で分泌される生理活性ペプチドは一定濃度とリズムを持つており、現在の注射剤では生体のリズムにあつた濃度に調節するのは極めて困難であり、又、効果の持続時間も短い。現在、インシュリン等の生理活性ペプチドにおいて持続注入法が開発されているが、患者はポンプを体に常時付けておかなければならず、その繁雑さ、苦痛は否めない。

この様に、生理活性ペプチド製剤においては、貴重な薬物をできる限り少量で、有効性を発揮させ、且つ、投与回数も少なく、一定濃度に維持し、長時間効果が持続しうる製剤が望まれている。

一方、ヒアルロン酸は眼の硝子体、関節腔、腱帯に高濃度に含有されているほか、その他の組織中にも普遍的に存在している生体成分である。この物の存在意義としては組織構造の維持、機械的刺激に対する緩衝作用(皮膚の弾力性、関節にお

ける潤滑性)、及び生体における物質の拡散を制御している等が推測されている。高分子ヒアルロン酸またはその塩の水溶液は非ニュートン流体のパターンを示し、流動していない場合には高粘性物質として挙動する。上記溶液中での化学物質の拡散はヒアルロン酸が水に溶解したとき高粘性の媒体として作用する為、一般に水中と比較し、遅くなることが知られていた(J. Physiol. (1961) 156, 67-74)。しかし、詳細な研究の結果、グルコースのような物質は他の物質とは逆に、ヒアルロン酸溶液中では、拡散速度が数倍速くなることが確認(J. Biological chemistry 257, 23, 14134-14135 (1982))されるに至り、この拡散速度遅延または加速は化合物とヒアルロン酸との相互作用によつて決定されるのではないかと考えられる。

又、ヒアルロン酸を含有する医薬製剤を目的とする特許としては特開昭58-57319、同80-58922、同80-84225等が知られており、これらはヒアルロン酸の上記緩衝作用を医薬製剤に応用したもの

であり、発明内容は点眼剤、生体組織の保護剤である。又、特開昭82-129226にはヒアルロン酸の拡散遅延性を利用した薬剤放出システムが開示されているが、生理活性ペプチドについては記載されていない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明の目的は持続時間が顕著に延長された生理活性ペプチド製剤を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

本発明はヒアルロン酸又はその非毒性塩を有効成分として含有し、生理活性ペプチドの効果を保持させることを特徴とする生理活性ペプチド持続製剤に係る。

本発明者らは生理活性ペプチド製剤の改良を種々研究し、試みたところ、ある一定の濃度範囲に調節したヒアルロン酸が生理活性ペプチドの効果を生理活性ペプチド単独で投与した場合と比較し、持続時間を顕著に延長することを見出し、本発明を完成するに至つた。

本発明で使用するとアルロン酸及びその非毒性

塩としては分子量20万~500万(粘度法)、好ましくは50万~300万程度のものであり、非毒性の塩としてはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属塩等である。

本剤で特に好ましいのはナトリウム塩である。ヒアルロン酸及びその塩の製造方法については特開昭58-37001、同58-57319号公報に記載されている。本発明で使用されるヒアルロン酸は医薬用、例えば、皮下ないし、生体組織中に注入しても支障をきたさない程度に精製されたものであれば良い。配合する生理活性ペプチドとしては、生体中、微量で種々の生理活性を示す分子量が約1000~100万のものであり、その代表としてはペプチドホルモンが挙げられる。生理活性ペプチドとしては副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン、卵巣刺激ホルモン、ソマトメジン、成長ホルモン放出因子、上皮成長因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、ソマトスタチン、プロラクチン、バソプレシン、バソトシン、ノソトシ

ン、イソトシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、カルシトニン、インシュリン、グルカゴン、レニン、アンジオテンシン(I, II, III)、ガストリン、セクレチン、パンクレオザイミン、エンテロガストロン、パロチン等のペプチドホルモン、カリクレイン、インターフェロン(IFN)、インターロイキン、腫瘍壊死因子(TNF)、メトロロチオネイン、スーパーオキシドジスムターゼ、コロニー形成刺激因子、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)等のその他のペプチド、及び、

$\alpha^{1-25}NH_2-D Ser^1-I Leu^4-Val^{12}-ACTH$ (副腎皮質刺激ホルモン)、 $\alpha^{1-25}NH_2-D Ser^1-I Leu^4-Lys^{17}-Lys^{18}-Val^{25}-ACTH$ 、エルカトニン、 β -ナフチル-アゾ-ポリスチレン-インシュリン、ポリ-N-ビニルピロリドン-インシュリン、トリアセチルインシュリン、 A_{12} 、 B_{28} -アジポイル-インシュリン、 A_{21} -リグル-インシュリン等のそれら誘導体が使用できる。上記生理活性ペプチドは通常、哺乳動物(ヒト、サル、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウサギ、クジラ

等)、魚類(カツオ、サケ等)、鳥類(ニワトリ等)等から抽出精製した天然由来、半合成及び遺伝子組み替えを含む、合成のものであつても良い。生理活性ペプチドの配合割合としては該ペプチドの投与を必要とする患者により、一概には決定できないが、通常、従来、臨床上の一団分の投与量で良い。具体的には、例えば成長ホルモン1~5国際単位、卵胞刺激ホルモン50~100国際単位、バソプレシン10~30単位、オキシトシン1~5単位、カルシトニン40~200単位、エルカトニン10~50単位、インシュリン20~100単位、グルカゴン1~3 USP単位、ガストリン0.1~0.5mg、セクレチン30~100セクレチン単位、パロチン1~5mg、カリクレイン20~50単位、インターフェロン β 100~500万単位を一製剤当り含有しているのが好ましい。ヒアルロン酸及びその非毒性塩の配合割合は0.1~10%が好ましい。0.1%未満の配合割合では効率的な持続効果が得られず、10%を超える配合割合では皮下に注射することが困難になること、注射後の組織中におけるヒアルロン酸の残存

に問題が生じる可能性のあることを考慮する必要がある。0.1~10%の範囲においては、配合割合に応じ、持続効果も延長する。更に、好ましい配合割合は3~7%程度である。

本持続製剤の投与方法として、最も好ましいのは非経口的投与である。通常、生理活性ペプチドの投与方法としては注射であり、特に、皮下注射による投与が行われる。又、本発明の持続製剤は高い粘度を有しており、医師または患者がアンプルから注射器を使用し、本持続製剤を吸引し、使用することも可能であるが、好ましくは、本製剤の製造の際、注射器内に本持続製剤を無菌状態で注入し、製品化したものを使用する。注射剤の調製は公知の注射剤の調製法に準じて行うことができるが、ヒアルロン酸溶液の高粘性のため、液剤の中に入る気泡の混入を避けることが重要である。気泡を除去する方法としては、溶解もしくは懸濁した液剤をアンプル又は注射器に注入し、脱気する。脱気方法としては遠心分離(3000rpm、15分程度)、又は減圧による方法が使用できる。本発明

の持続製剤には通常本分野で使用される種々の添加剤を添加しうる。添加剤としては局所麻酔剤、pH調節剤、抗酸化剤、溶解補助剤、等張化剤等がその代表的なものである。

(実施例)

以下に本発明の実施例を示す。

実施例1 カルシトニン皮下注射製剤の製造

ブタカルシトニン(Aresour Pharmaceutical Company Ltd. 製)8 MRC単位を1mlの生理食塩水に溶解し、ヒアルロン酸ナトリウムを加える。充分溶解した後、アンプルに注入し、気泡を脱気するため遠心分離(3000rpm、15分)操作を行い、封管し、カルシトニン皮下注射剤とする。

ブタカルシトニン	8 MRC単位
ヒアルロン酸ナトリウム	50mg
注射用生理食塩水	適量
—アンプル当り	1ml

実施例2

実施例1と同様に下記配合割合でインシュリン

皮下注射剤を製造した。

ブタインシュリン	5単位
ヒアルロン酸ナトリウム	50mg
注射用生理食塩水	適量
一アンプル当り	1ml

実施例3

実施例1と同様に下記配合割合でヒト成長ホルモ
ン皮下注射剤を製造した。

ヒト成長ホルモン	1単位
ヒアルロン酸ナトリウム	50mg
注射用生理食塩水	適量
一アンプル当り	1ml

実施例4

実施例1と同様に下記配合割合でエルカトニ
ン皮下注射剤を製造した。

エルカトニン	8単位
ヒアルロン酸ナトリウム	50mg
注射用生理食塩水	適量
一アンプル当り	1ml

下記配合割合にて皮下注射剤を調製し、実験に
使用した。

比較例1

ヒアルロン酸ナトリウム	50mg
注射用生理食塩水	適量
全量	1ml

比較例2

ブタインシュリン	5単位
注射用生理食塩水	適量
全量	1ml

18時間絶食した8週齢の雄性ワイスター系ラッ
ト背部皮下に、1ml/kgの投与量で実施例2、及
び上記注射剤を投与した。一定時間毎に、約
0.4mlずつ採血し、インスロテックモチゲ(持田
製薬(株)製)のキットを用いて血中インシュリン
濃度を酵素免疫測定方法(ホルモンと臨床、26巻、
283頁、1978年)で測定した。又、別に同様な実験
条件下、血糖も測定した。第1表にその結果を示
す。

実施例5

アンプルを注射前に代え、実施例1と同様に下
記配合割合でインシュリン皮下注射剤注入した注
射剤を製造した。

ブタインシュリン	5単位
ヒアルロン酸ナトリウム	30mg
ベンジルアルコール	10mg
注射用蒸留水	適量
一注射筒当り	1ml

実施例6

アンプルを注射筒に代え、実施例1と同様に下
記配合割合でヒト成長ホルモン皮下注射剤を製造
した。

ヒト成長ホルモン	1.5単位
ヒアルロン酸ナトリウム	30mg
注射用蒸留水	適量
一注射筒当り	1ml

(薬理試験結果)

1. 持続作用(インシュリン)

第1表

薬 剤	投与後の血中インシュリン濃度(μunit/ml)							
	投与前	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	12時間
比較例1	2	6	5	4	3	3	5	3
比較例2	5	1563	182	29	14	11	10	10
実施例2	4	133	85	83	69	41	25	17

薬 剤	投与後血糖値/投与前血糖値(%)							
	投与前	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	12時間
比較例1	100	99	100	97	105	88	81	85
比較例2	100	44	38	73	86	85	86	90
実施例2	100	60	55	48	51	48	57	75

比較例1において、血中インシュリン濃度に対
して、ヒアルロン酸ナトリウムは影響を与えてい
ない。比較例2においては投与直後に大きなイン
シュリン血中濃度が出現したが、4時間目には消
失している。これはインシュリンを皮下投与した
場合、通常観察される現象であり、一過性のピー

クの出現後、血中インシュリンの持続が見られない。これに対して、実施例2の注射剤は比較例2で観察された投与直後の高濃度の血中インシュリンのピークが消失したかわりに投与後、10時間にわたり、血中インシュリン濃度が適当な濃度で持続している。ヒアルロン酸を配合しない場合(比較例2)と比較して約2.5倍の持続時間の延長が確認された。

2. 持続、増強作用(カルシトニン)

下記配合割合にて皮下注射剤を調製し、実験に使用した。

比較例3

ブタカルシトニン 8 MRC単位
注射用生理食塩水 適量
全量 1 ml

18時間絶食した8週齢の雄性ウイスター系ラット背部皮下に、1 ml/kgの投与量で実施例1、比較例2、及び上記注射剤を投与した。一定時間毎に、約0.4 mlずつ採血し、カルシウムテストワコ

作用も小さく、効果の持続時間も短い。実施例1は血中カルシウム濃度低下作用も大きく、効果持続時間も長い。このようにカルシトニンとヒアルロン酸ナトリウムを混合した本発明製剤はカルシトニン単独投与と比較し、持続時間の延長を示した。

次に、本発明皮下注射剤のカルシトニンの効果増強作用を確認するため下記手順で実験を行った。

持続時間の延長実験と同様な操作で、ブタカルシトニンを0、1、2、4、8及び12 MRC単位を含む皮下注射剤を調製し、ラットに投与した。カルシトニンの投与により減少した血中カルシウム濃度を測定し、各カルシトニン投与量について減少血中濃度曲線下面積を求めた。第1図にその結果を示す。

第1図からは次のように読取れる。例えば10 mg/hr/dlの減少血中カルシウム濃度曲線下面積を得るためには、ブタカルシトニン単独投与ではブタカルシトニン5.6 MRC単位/kgが必要であるのに対し、ヒアルロン酸併用投与の場合、1.4 M

〔和光純薬(株)製〕のキットを用いて血中カルシウム濃度をオルトクレゾールフタレインコンプレキシソン法(アナリティカル バイオケミストリー、18巻、521頁、1967年)で測定した。第2表にその結果を示す。

第2表

薬 剤	投与後の血中カルシウム濃度 (mg/dl)							
	投与前	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	12時間
比較例1	9.38	9.56	9.54	9.41	9.41	9.08	8.98	8.87
比較例3	9.48	7.14	8.49	7.94	8.23	8.91	9.02	9.06
実施例1	8.47	6.98	6.12	5.60	5.71	7.99	8.77	8.82

カルシトニンはカルシウム代謝の恒常性に関与し、32個のアミノ酸からなる生理活性ペプチドである。

比較例1において、血中カルシウム濃度に対して、ヒアルロン酸ナトリウムは影響を与えていない。比較例3においては投与直後にカルシトニンが血中カルシウム濃度低下作用を示したが、低下

R C単位/kgであり、必要なブタカルシトニンは単独投与に比較し、約1/4の量で充分である。

3. 持続、増強作用(エルカトニン)

下記配合割合にて皮下注射剤を調製し、実験に使用した。

比較例4

エルカトニン 8 MRC単位
注射用生理食塩水 適量
全量 1 ml

18時間絶食した8週齢の雄性ウイスター系ラット背部皮下に、1 ml/kgの投与量で実施例4、比較例1、及び上記注射剤を投与した。一定時間毎に、約0.4 mlずつ採血し、カルシウムテストワコ〔和光純薬(株)製〕のキットを用いて血中カルシウム濃度をオルトクレゾールフタレインコンプレキシソン法(アナリティカル バイオケミストリー、18巻、521頁、1967年)で測定した。第3表にその結果を示す。

第 3 表

薬 剤	投与後の血中カルシウム濃度 (mg/dl)							
	投与前	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	12時間
比較例1	9.61	9.68	9.69	9.64	9.51	9.28	9.49	9.64
比較例4	9.70	7.48	7.01	6.65	6.30	7.78	8.96	9.28
実施例4	9.33	7.16	6.68	6.10	5.75	6.38	6.44	6.58

エルカトニンはカルシウム代謝の恒常性に関与するカルシトニンの分子中に存在するジスルフィド結合をエチレン結合にかえた、カルシトニンの誘導体である。比較例1において、血中カルシウム濃度に対して、ヒアルロン酸ナトリウムは影響を与えていない。比較例4においては投与直後にエルカトニンはカルシトニンに比べ強い血中カルシウム濃度低下作用を示したが、投与後10時間で効果が消失した。実施例4が示したように、エルカトニンとヒアルロン酸ナトリウムを併用投与した場合、血中カルシウム濃度低下作用は持続してい

比較例5

ヒト成長ホルモン	1単位
注射用生理食塩水	適量
全量	1ml

18時間絶食した8週齢の雄性ウイスター系ラット背部皮下に、1ml/kgの投与量で実施例3、比較例1、及び上記注射剤を投与した。一定時間毎に、約0.4mlずつ採血し、血中ヒト成長ホルモン濃度をラジオイムノアッセイ法で測定した。第4表にその結果を示す。

第 4 表

薬 剤	投与後の血中ヒト成長ホルモン濃度 (μ Ung/dl)							
	投与前	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	12時間
比較例1	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例5	—	326.7	195.5	39.8	2.2	—	—	—
実施例3	—	23.2	26.6	26.1	25.8	17.1	14.0	10.6

る。このように、エルカトニンとヒアルロン酸ナトリウムを混合した本発明製剤は持続時間の延長を示した。

持続時間の延長実験と同様な操作で、エルカトニンを0, 1, 2, 4, 8及び12MRC単位を含む皮下注射剤を調製し、ラットに投与した。エルカトニンの投与により減少した血中カルシウム濃度を測定し、各エルカトニン投与量について減少血中濃度曲線下面積を求めた。第2図にその結果を示す。

第2図からは次のように論取れる。例えば10mg・hr/dlの減少血中カルシウム濃度曲線下面積を得るためには、エルカトニン単独投与ではエルカトニン1.9MRC単位/kgが必要であるのに対し、ヒアルロン酸併用投与の場合、1.0MRC単位/kgであり、必要なエルカトニンは単独投与に比較し、約1/2の量で充分である。

4. 持続作用(ヒト成長ホルモン)

下記配合割合にて皮下注射剤を調製し、実験に使用した。

比較例1において、ヒアルロン酸ナトリウムはヒト成長ホルモンを血中に出現させなかった。

比較例5においては投与直後に高濃度のヒト成長ホルモンが血中に観察されるが、4時間後には血中から消失した。これに対し、実施例3のヒアルロン酸ナトリウムを併用投与した場合は、実に12時間後も血中にヒト成長ホルモンが存在しており、明らかに、持続型の注射剤であることを示している。正常成人男子の血清中ヒト成長ホルモン濃度は $20 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ で維持されているといわれている。現在、ヒト成長ホルモン剤の供給に制限があるため、できうる限り、少量で高い効果を得る目的で様々な試みがなされている。例えば、投与回数を分割(治療学, 9, (2), 264, 1982)することなどが試みられている。本発明製剤は投与したヒト成長ホルモンを一定血中濃度に長時間持続させることが可能である。

参考例(テカフェール)

下記配合割合にて皮下注射剤を調製し、実験に使用した。

比較例 6

テガフル	10mg
ヒアルロン酸ナトリウム	50mg
注射用生理食塩水	適量
全量	1ml

比較例 7

テガフル	10mg
注射用生理食塩水	適量
全量	1ml

18時間絶食した8週齢の雄性ウイスター系ラット背部皮下に、1ml/kgの投与量で上記注射液を投与した。一定時間毎に、約0.4mlずつ採血し、血中テガフル濃度を液体クロマトグラフィーで測定した。第5表にその結果を示す。

第 5 表

薬 剤	投与前	投与後の 5-FU 濃度 (mg/ml)						
		1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	12時間
比較例 6	—	18.34	17.78	14.24	11.65	3.79	3.94	2.94
比較例 7	—	15.52	17.47	14.83	11.82	4.14	3.66	3.16

テガフルは化学名が1-(2-テトラヒドロフリル)-5-フルオロウラシルであり、5-フルオロウラシル(5-FU)を放出し、抗腫瘍作用を発揮する抗悪性腫瘍剤である。

比較例7に見られるように、テガフル単独投与後の血中テガフル濃度は6時間後まで比較的高濃度であり、8時間以降は低濃度が持続した。比較例6に見られるように、テガフルとヒアルロン酸を併用投与しても、持続効果は観察されていない。

4. 図面の簡単な説明

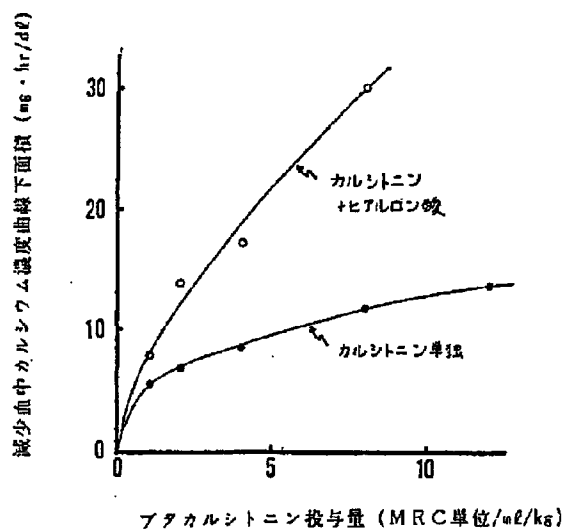
第1図及び第2図はカルシトニン投与量及びエルカトニン投与量と、それぞれの減少血中カルシウム濃度曲線下面積の関係を示すグラフである。

(以 上)

出 願 人 大陽薬品工業株式会社

代 理 人 弁 理 士 田 村 康

第 1 図



第 2 図

